

Prof. dr hab. Barbara Machura

Katowice, 21.07.2020

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Moniki Katarzyny Lesiów
z tytułem „Charakterystyka i aktywność prooksydatywna kompleksów Cu(II)
z fragmentami białka FomA *Fusobacterium nucleatum*”
wykonanej w Zespole Zastosowań Strukturalnych EPR Wydziału Chemii Uniwersytetu
Wrocławskiego pod kierunkiem dr hab. Aliny Bieńko, prof. UWr
oraz dr Urszuli Komarnickiej jako promotora pomocniczego**

Przedłożona do recenzji praca porusza bardzo aktualną i ważną tematykę związaną z procesami nowotworzenia komórek jelita grubego w efekcie dysbiozy mikroflory jelitowej. Rak jelita grubego to jeden z najgroźniejszych i najbardziej podstępnych nowotworów złośliwych. Przez długi okres czasu rozwija się w organizmie człowieka zupełnie bezobjawowo. Zgodnie z danymi Światowej Organizacji Zdrowia zajmuje trzecie miejsce pod względem zapadalności, a drugie – biorąc pod uwagę liczbę zgonów. Z tych względów prace badawcze nad etiologią i mechaniką powstawania tego nowotworu zaliczane są do jednych z najważniejszych wyzwań współczesnej nauki.

W centrum naukowego zainteresowania Doktorantki znalazły się procesy koordynacji jonów miedzi(II) do różnych fragmentów głównego białka błony zewnętrznej bakterii beztlenowej *Fusobacterium nucleatum* (Fn), której nagromadzenie, wraz ze znacznym wzrostem stężenia jonów miedzi i wzmożoną produkcją reaktywnych form tlenu (RFT), potwierdzono w tkankach nowotworowych jelita grubego. Poczynione w 2012 roku obserwacje mogą wskazywać na kluczowy udział w procesie kancerogenezy reakcji rodnikowych będących efektem aktywności metaloprotein z udziałem jonów miedzi i białek *Fusobacterium nucleatum*. Biorąc pod uwagę złożoność interakcji pomiędzy stanem zapalnym, mikroflorą jelitową, predyspozycjami genetycznymi człowieka i czynnikami

środowiskowymi, postawiona hipoteza, zakładająca istnienie związku pomiędzy prooksydatywną rolą jonów Cu(II) a wchodzącymi z nimi w oddziaływanie białkami powierzchniowymi bakterii *Fn* i nowotworem jelita grubego, wymaga jeszcze wielu szczegółowych badań. W ten nurt prac badawczych wpisuje się właśnie praca doktorska mgr Moniki Lesiów. Nie mam żadnych wątpliwości, że wyniki badań Doktorantki stanowią ważny krok na drodze do lepszego zrozumienia mechanizmu nowotworzenia komórek jelita grubego.

Rozprawa doktorska mgr Moniki Lesiów została przygotowana w układzie typowym dla prac eksperymentalnych, obejmującym dwie zasadnicze części – literaturową i doświadczalną. W pierwszym rozdziale przeglądu literaturowego Doktorantka przedstawia koncepcję aktywności nowotworowej bakterii *Fusobacterium nucleatum*. W mojej opinii ten rozdział zasługuje na szczególne wyróżnienie. Przedstawione w nim zagadnienia i dane literaturowe znakomicie uzasadniają podjęcie badań nad kompleksami Cu(II) z fragmentami białka FomA bakterii *Fn* w powiązaniu z procesami powstawania nowotworu jelita grubego. Następnie Autorka prezentuje krótką charakterystykę miedzi jako pierwiastka z uwzględnieniem roli jonów miedzi w żywym organizmie, jej dostarczaniem do organizmu i transportem wewnątrzkomórkowym. Kolejne podrozdziały dotyczą struktury peptydów, ich zdolności wiązania jonów metali oraz znaczenia peptydowych kompleksów miedzi. Doktorantka przybliży także Czytelnikowi zagadnienia związane z powstawaniem reaktywnych form tlenu i efektami stresu oksydacyjnego. Część literaturową rozprawy kończy rozdział przedstawiający podstawy teoretyczne stosowanych przez Nią metod badawczych. Doktorantka dokonuje opisu metody miareczkowania potencjometrycznego, elektronowej spektroskopii absorpcyjnej w zakresie UV-Vis, elektronowej spektroskopii emisyjnej w zakresie UV-Vis, spektroskopii dichroizmu kołowego, spektroskopii elektronowego rezonansu paramagnetycznego, spektrometrii mas oraz elektroforezy w żelu agarozowym. Zaletą tego fragmentu są krótkie wyjaśnienia celowości zastosowania danej metody w trakcie realizacji badań własnych oraz uwzględnienie danych liczbowych dla analogicznych układów, co jest istotne w kontekście interpretacji wyników dla otrzymanych przez Autorkę peptydowych form kompleksowych, w szczególności do określenia modelu koordynacji w tych kompleksach. W mojej opinii dobrym uzupełnieniem tego rozdziału byłyby opis technik identyfikacji reaktywnych form tlenu oraz przedstawienie podstaw

metodyki badań biologicznych i mikrobiologicznych. Biorąc jednak pod uwagę, że Doktorantka omawia szczegółowo sposoby wykrywania RFT w rozdziale „*Monitorowanie generacji reaktywnych form tlenu (RFT)*”, a przy opisie badań biologicznych i mikrobiologicznych wprowadza szereg dodatkowych uzupełnień i wyjaśnień, powyższa uwaga dotyczy właściwie układu pracy, a nie stanowi zarzutu merytorycznego.

Generalnie, część literaturową uważam za kompetentne opracowanie, w którym Autorka wykazała się dobrą znajomością literatury przedmiotu. Zawarte w niej treści stanowią dobre wprowadzenie Czytelnika do tematyki pracy doktorskiej i metodologii badań. Wielowątkowość przeglądu literaturowego jest konsekwencją szerokiego zakresu badań prowadzonych przez Doktorantkę. Przedłożona rozprawa ma bowiem charakter interdyscyplinarny, wpisując się w zagadnienia z zakresu chemii, biologii i medycyny.

Cel i założenia rozprawy zostały jasno sformułowane. Ligandy peptydowe stanowiące fragmenty głównego białka błony zewnętrznej *Fusobacterium nucleatum* (nazywanego w skrócie białkiem FomA) zostały wybrane do badań w sposób bardzo przemyślany i trafny. Dobrano je tak, by z jednej strony możliwie jak najlepiej imitowały strukturę przestrzenną pętli białkowej i zapewniały możliwość efektywnego wiązania jonów Cu(II), a z drugiej – by dawały możliwość zbadania wpływu liczby reszt histydylowych i ich położenia w sekwencji łańcucha peptydowego na stechiometrię, trwałość termodynamiczną oraz geometrię otrzymanego kompleksu Cu(II), a następnie pozwoliły wyznaczyć korelacje pomiędzy sposobem wiązania jonów Cu(II) a aktywnością prooksydatywną kompleksu Cu(II). Dodatkowo, jeden z ligandów peptydowych poddano cyklizacji celem określenia wpływu modyfikacji strukturalnej szkieletu peptydowego na proces wiązania jonów metalu. W rezultacie przedmiotem badań Autorki było szereg form kompleksowych Cu(II) powstałych w reakcji jonów miedzi(II) z siedmioma różnymi fragmentami białka FomA w szerokim zakresie pH roztworu (2,5 - 10,5), ze szczególnym uwzględnieniem układów odpowiadającym wartościom pH jelita grubego (pH od 5,5 do 7,5). Również zakres prowadzonych przez Doktorantkę prac badawczych był bardzo szeroki, obejmując:

- szczegółową analizę strukturalną układów peptydowych miedzi(II) w oparciu o dane potencjometryczne, widma ESI-MS i wyniki metod spektroskopowych UV-Vis, CD i EPR;

- identyfikację RFT generowanych przez ligandy peptydowe i ich kompleksy Cu(II) w obecności nadtlenku wodoru, kwasu askorbinowego i mieszaniny tych dwóch substancji;
- weryfikację czy zaprojektowane ligandy peptydowe i ich kompleksy miedzi(II) są zdolne do stymulowania mysich komórek raka okrężnicy komórki CT26 do zewnątrz- i wewnątrz-komórkowej produkcji RFT, wraz z oceną zdolności wytworzonych RFT do peroksydacji lipidów;
- zbadanie interakcji pomiędzy szczepem bakteryjnym *Fusobacterium nucleatum* subsp. *polymorphum* DSM 20482 a jonami Cu(II) i nadtlenkiem wodoru.

Tak szerokie spektrum badań było możliwe dzięki współpracy z Zespołem Fizykochemii Koordynacyjnej i Bionieorganicznej kierowanym przez prof. dr hab. Grażynę Stochel na Wydziale Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego oraz Zakładem Mikrobiologii kierowanym przez prof. dr hab. Gabrielę Bugłę-Płoskońską w Instytucie Genetyki i Mikrobiologii Wydziału Nauk Biologicznych Uniwersytetu Wrocławskiego. Co jednak szczególnie istotne w kontekście recenzji niniejszej pracy doktorskiej, eksperymenty biologiczne i mikrobiologiczne zostały wykonane samodzielnie przez Doktorantkę w ramach stażów naukowych w tych jednostkach.

Korzystając z szerokiej gammy metod eksperymentalnych mgr Monika Lesiów zrealizowała wszystkie założone cele. Wykazała szereg istotnych zależności pomiędzy sposobem wiązania jonów miedzi(II) do fragmentów białka *Fn* a zdolnością powstałych peptydowych kompleksów do generacji RFT. Do najważniejszych osiągnięć Doktorantki zaliczam:

- wyznaczenie modeli koordynacyjnych dla otrzymanych form kompleksowych Cu(II) z badanymi fragmentami białka FomA *Fusobacterium nucleatum*;
- wykazanie, że reaktywnymi formami tlenu generowanymi przez peptydowe kompleksy miedzi(II) w obecności nadtlenku wodoru, kwasu askorbinowego i ich mieszaniny są w głównej mierze rodnik hydroksylowy i tlen singletowy, rzadziej rodnik nadtlenkowy, a anionorodnik ponadtlenkowy nie powstaje;
- określenie wpływu modelu koordynacyjnego kompleksu na poziom generowanych wolnych rodników i potwierdzenie udziału RFT w procesach uszkodzenia DNA;

- wykazanie, że formy kompleksowe jonów miedzi(II) z fragmentami białka FomA stanowią reprezentatywny model do badania interakcji Cu(II)–białko bakterii–komórka gospodarza;
- potwierdzenie wewnątrz- i zewnątrzkomórkowej produkcji RFT przez komórki CT26 stymulowane peptydowymi kompleksami Cu(II);
- wykazanie powstawania uszkodzeń wielonienasyconych kwasów tłuszczowych w efekcie wewnątrzkomórkowego wyrzutu RFT w mysich komórkach raka okrężnicy (CT26) traktowanych kompleksami Cu(II) z fragmentami białka FomA oraz potwierdzenie związku pomiędzy stężeniem dialdehydu malonowego (MDA) a poziomem RFT;
- Udowodnienie, że szczep *Fusobacterium nucleatum* DSM 20482 z dodatkiem jonów Cu(II) i w obecności nadtlenu wodoru jest zaangażowany w produkcję wolnych rodników, najprawdopodobniej generowanych na zewnątrz komórki bakteryjnej.

Osiągnięcia Autorki uważam za znaczące, a przedstawiony w rozprawie materiał badawczy w mojej opinii znacznie przekracza wymagania stawiane rozprawom doktorskim. Oceniając uzyskane przez Doktorantkę wyniki pragnę także podkreślić, że ich wartość merytoryczna została już w zdecydowanej części pozytywnie zweryfikowana przez grupę specjalistów realizujących badania w tej dziedzinie. Większość wyników badań przeprowadzonych i dyskutowanych przez Doktorantkę w rozprawie doktorskiej została opublikowana. Były one przedmiotem 5 prac oryginalnych, które ukazały się w renomowanych czasopismach naukowych w latach 2018 - 2020: *Dalton Transactions* (IF = 4,052), *Metallomics* (IF = 3,571), *Chemical Research in Toxicology* (IF = 3,278), *Future microbiology* (IF = 2,746). W czterech z nich Pani mgr Monika Lesiów jest pierwszym z autorów, co jednoznacznie wskazuje na Jej wiodący udział. Trzy kolejne prace bezpośrednio związane z tematyką rozprawy doktorskiej są na etapie przygotowywania lub zostały już wysłane do redakcji czasopism. Natomiast dorobek naukowy Autorki uzupełniają trzy inne publikacje niezwiązane z tematyką pracy doktorskiej, które ukazały się w czasopismach z listy filadelfijskiej (*Journal of Inorganic Biochemistry* (IF = 3,224) i *Metallomics* (IF = 3,571)), trzy artykuły w *Wiadomościach Chemicznych* oraz dwie prezentacje posterowe i pięć wystąpień ustnych na konferencjach krajowych (2) i międzynarodowych (6). Z załączonych materiałów wynika również,

że mgr Monika Lesiów kierowała jednym projektem badawczym z dotacji celowej z Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego, była wykonawcą w dwóch grantach finansowanych przez Narodowe Centrum Nauki oraz odbyła dwa krajowe staże naukowe, o których już wspominałam wcześniej. Dorobek publikacyjny i aktywność naukową Doktorantki na tym etapie kariery naukowej uznaję za wyróżniające. Wyrazem uznania dla osiągnięć naukowych Doktorantki są także trzy stypendia Rektora Uniwersytetu Wrocławskiego dla najlepszych doktorantów, trzy stypendia projakościowe oraz stypendium doktoranckie im. Ludwika Sosabowskiego.

Oceniając formalną stronę pracy stwierdzam, że rozprawa doktorska została przygotowana bardzo starannie, jest napisana poprawnym językiem, cechuje się przejrzystą szatą graficzną z rysunkami wysokiej jakości, które dobrze obrazują zagadnienia poruszane w części literaturowej oraz dobrze dokumentują wyniki badań własnych. Będąc jednak zdecydowaną zwolenniczką syntetycznych opisów, pewne moje wątpliwości budzi przyjęty przez Doktorantkę sposób prezentacji i dyskusji wyników badań odnoszący się do poszczególnych par: kompleksów Cu(II) z peptydami 1L i 2L, kompleksów Cu(II) z peptydami 3L i 4L, kompleksów Cu(II) z peptydami 5L i 6L, i oddzielnie form kompleksowych Cu(II) z cyklicznym ligandem oznaczonym jako 7L. Wprawdzie pozwoliło to Autorce dokonać bardzo dogłębnej analizy badanych układów, ale z drugiej strony spowodowało, że praca w niektórych fragmentach jest w mojej opinii przesadnie rozbudowana. Powyższa uwaga jednak nie umniejsza mojej bardzo wysokiej oceny recenzowanej pracy.

W podsumowaniu pragnę jeszcze podkreślić, że Doktorantka właściwie zidentyfikowała problemy badawcze, prawidłowo dobrała metody badawcze, korzystała z szeregu zaawansowanych eksperymentów, w tym przykładowo pułapkowania spinowego EPR w warunkach komórkowych. Przedstawiła prawidłową interpretację wyników swoich badań, wykazując się w tym względzie dużą wiedzą i umiejętnościami w obszarze badań i stosowanych technik badawczych.

Z pełnym przekonaniem stwierdzam, że rozprawa doktorska pt. *„Charakterystyka i aktywność prooksydatywna kompleksów Cu(II) z fragmentami białka FomA Fusobacterium nucleatum”* autorstwa Pani mgr Moniki Lesiów w pełni spełnia wymagania stawiane pracom doktorskim określone Ustawą z dnia 3 lipca 2018 r. *„Przepisy wprowadzające ustawę - prawo*

o szkolnictwie wyższym i nauce” (Dz.U. z 2018 r., poz. 1669), Ustawą z dnia 14 marca 2003r. „*O stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki*” (Dz.U. 2003 Nr 65, poz. 595, z późniejszymi zmianami) oraz Rozporządzeniem Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 19 stycznia 2018r. (Dz.U. z 2018 r., poz. 261), i na tej podstawie wnoszę o dopuszczenie Panią mgr Monikę Lesiów do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Uwzględniając natomiast aktualność i ważkość podjętej tematyki badawczej, kompleksowość badań o charakterze interdyscyplinarnym oraz wartość merytoryczną uzyskanych wyników, które w zdecydowanej części zostały już opublikowane w prestiżowych czasopismach z listy filadelfijskiej wnoszę do Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Chemiczne Uniwersytetu Wrocławskiego o wyróżnienie rozprawy mgr Moniki Lesiów.

Barbara Machura